

ANNA TRUSEK-HOŁOWNIA

AKTYWNOŚĆ I STABILNOŚĆ KATALAZY IMMOBILIZOWANEJ W KAPSUŁKACH ALGINIANOWYCH W APLIKACJACH PRZEMYSŁOWYCH

Streszczenie

Efektywną metodą zahamowania rozwoju zanieczyszczeń mikrobiologicznych (bakteryjnych i grzybowych) obecnych w wodzie pitnej, mleku czy w sokach jest dodanie nadtlenu wodoru. Technika ta nie jest w Polsce powszechnie stosowana, jest jednak dopuszczona w wielu krajach pod warunkiem całkowitego usunięcia dodanego nadtlenu wodoru przed dopuszczeniem produktu do spożycia lub do dalszych etapów przetwarzania. Szybką metodą usunięcia nadtlenu wodoru może być zastosowanie enzymu – katalazy.

W celu możliwości wielokrotnego użycia preparatu enzymatycznego, jak i łatwej jego separacji z mieszaniny reakcyjnej, zaproponowano immobilizację katalazy w kapsułkach alginianowych. Przeanalizowano możliwość zastosowania otrzymanego preparatu do usuwania H_2O_2 dodanego do różnych płynów: wody, mleka, soków warzywnych. Określono stabilność preparatu w warunkach procesowych (11 i 24 °C) i w temperaturze przechowywania preparatu (4 °C). Wyznaczone w buforach o danym pH stałe równania kinetycznego zweryfikowano w badaniach wymienionych płynów. Na podstawie parametrów kinetycznych określono warunki do przeprowadzenia procesu o założonej wydajności. Zaproponowano proces okresowy z separacją preparatu na sitach. Podano czas procesu dla poszczególnych szarzy. W przypadku, gdy temperatura procesu zostanie obniżona do 11 °C, czas reakcji musi być znacząco dłuższy, niemniej liczba przeprowadzonych szarzy (z uwagi na zachowaną aktywność preparatu) rekompensuje dłuższy czas procesu. Prowadzenie reakcji w obniżonej temperaturze jest uzasadnione w przypadku, gdy medium oczyszczane jest przetrzymywane w warunkach chłodniczych, co zwykle ma miejsce. Temp. 11 °C jest najniższą wartością, w której stosowany enzym wykazuje aktywność.

Słowa kluczowe: usuwanie nadtlenu wodoru, katalaza, kapsułki alginianowe, warunki procesowe

Wprowadzenie

Regulacje The World Food and Agriculture Organization oraz United Nations Agriculture Organization zezwalają na dodawanie nadtlenu wodoru (H_2O_2) do napo-

*Dr hab. inż. A. Trusek-Hołownia, prof. PWr., Zakład Inżynierii Bioprocusowej i Biomedycznej, Wydz. Chemiczny, Politechnika Wroclawska, ul. Norwida 4/6, 50-373 Wrocław.
Kontakt: anna.trusek-holownia@pwr.edu.pl*

jów, w stężeniu 0,05 ÷ 0,25 % (m/v), w celu zahamowania rozwoju w nich drobnoustrojów. W literaturze przedmiotu proces ten nazywany jest „zimną sterylizacją” [3, 8], choć poprawniej byłoby go nazywać „czasową konserwacją napojów”.

W Polsce technologia ta nie jest rozpowszechniona, w odróżnieniu od wielu krajów, w tym Stanów Zjednoczonych. Stosowane stężenie H_2O_2 zależy od takich czynników, jak: temperatura procesu, liczba i typ mikroorganizmów obecnych w napoju, ich oporność na nadtlenek wodoru [9]. Zastosowana metoda nie ma wpływu na zawartość cennych składników. Dotyczy to m.in. wartości odżywczej mleka, szeroko opisaną w literaturze [1, 2, 6].

Dodawanie H_2O_2 najczęściej jest stosowane do ochrony mleka przy przewożeniu do miejsca przetwarzania. Z dobrą efektywnością nadtlenek wodoru może być dodawany do innych napojów np. soków, wina, piwa czy wody pitnej. Zawartość zanieczyszczeń mikrobiologicznych w tych mediach nie może być jednak duża [10]. Po wstępnych badaniach (redukcyjny posiew bakteryjny), przeprowadzonych na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej, dowiedziono, że po dodaniu 2,5 g H_2O_2 na litr świeżego mleka prawie wszystkie zanieczyszczenia mikrobiologiczne zostały wyeliminowane. Po usunięciu nadtlenu wodoru naturalny szczep mlekowy *Lactobacillus* namnażał się ze specyficzną dla siebie szybkością. Metodę tę można więc traktować jako hamującą rozwój zanieczyszczeń bakteryjnych i grzybiczych, a nie eliminującą komórki w fazie intensywnego wzrostu obecne w danym napoju.

Przed dopuszczeniem napoju do spożycia przez ludzi lub do dalszego przetwarzania zastosowany nadtlenek wodoru musi być całkowicie usunięty [9]. Samoistny rozkład H_2O_2 zachodzi bardzo powoli. W wyżej wspomnianym doświadczeniu przy stężeniu H_2O_2 – 2,5g/l, w środowisku o pH 5,2 i 7,0 po 1 h rozkładowi do wody uległo mniej niż 2 % cząsteczek H_2O_2 obecnych w roztworze. Proces ten można przeprowadzić ze znacznie wyższą efektywnością poprzez zastosowanie enzymu katalazy (H_2O_2 oksydoreduktazy). Z uwagi na koszt preparatu oraz niemożność jego usunięcia w postaci natywnej z oczyszczanego medium, jedyną formą aplikacji są preparaty enzymu immobilizowanego. W metodzie otrzymywania takiego preparatu wykorzystano naturalne substancje (polisacharydy), które mogą mieć styczność z żywnością [7]. Z uwagi na rozmiar cząstki ($\varnothing = 1 \div 5$ mm), uzyskany preparat jest łatwo separowany od oczyszczanego płynu np. poprzez dekantację lub filtrację i może być wielokrotnie stosowany.

Celem pracy była próba aplikacji enzymu immobilizowanego w kapsułkach alginianowych do usuwania nadtlenu wodoru z mleka, wody pitnej i soku warzywnego.

Material i metody badań

Katalaza (E.C. 1.11.1.6.) z trzustki wołowej, 2000 ÷ 5000 U/mg, alginian sodu, i bufor HEPES pochodziły z firmy Sigma Chemical Co. Nadtlenek wodoru i pozostałe

odczynniki zakupiono w firmie POCh (Gliwice). Świeże mleko kozie pochodziło z gospodarstwa Kozia Łąka w Łomnicy k. Jeleniej Góry, sok wielowarzywny – z firmy Tymbark.

Immobilizacja katalazy w kapsułkach alginianowych

W celu wytworzenia kapsułek alginianowych zawierających katalazę przygotowano dwa roztwory. Roztwór (1) zawierał 3-procentowy (m/v) alginian sodu. Roztwór (2) stanowił roztwór enzymu w buforze HEPES (50 mM, pH 6,4 lub 7,0) lub w buforze octanowym (pH 5,5). Stężenie enzymu w roztworze (2) było dwukrotnie wyższe aniżeli planowane w reakcji (tj. 2 lub 4 mg/l). Roztwór powstały ze zmieszania (1) i (2) w stosunku 1 : 1 wkraplano do łaźni sieciującej, zawierającej 10-procentowy (m/v) roztwór chlorku sodu w buforze o danym pH. Zastosowanie odpowiedniego buforu było niezbędne do zachowania aktywności katalitycznej enzymu. Do łaźni sieciującej dodawano również enzym o stężeniu identycznym jak w kapsułkach, w celu uniknięcia dyfuzji cząsteczek enzymu w trakcie procedury immobilizacji. Wykonany bilans masy enzymu (metoda Lowry'ego [4]) z łaźni sieciującej przed procesem i po uzyskaniu kapsułek potwierdził zasadność stosowania takiej procedury. Kapsułki sieciowano w temp. 4 °C przez 1 h. Uzyskane kapsułki były przejrzyste, w temp. 4 °C miały średnicę 3,2 mm, wynikającą z użytego wkraplacza. Z uwagi na naturę hydrożeli, w temp. 24 °C objętość kapsułek zwiększała się do średnicy 3,9 ÷ 4,1 mm (pomiar 20 wybranych losowo kapsułek).

Aktywność i stabilność preparatu enzymatycznego

Aktywność preparatu enzymatycznego określano w reakcji monitorowanej spektrofotometrycznie (spektrofotometr Shimadzu UV-1800) przy $\lambda = 230$ nm. Korzystano z zależności opisującej absorbancję (A) od stężenia nadtlenu wodoru (C_S): $A(230) = 1,97 \times C_S$ [g/l]. Zakres stosowania krzywej – do stężenia H_2O_2 równego 0,8 g/l. Wszystkie pomiary wykonywano w trzech próbkach, obliczano wartości średnie, odrzucając wyniki odbiegające o ± 10 %.

Wpływ temperatury i pH na aktywność i stabilność katalazy immobilizowanej w alginianie określano w termostatowanych reaktorach mieszalnikowych o objętości całkowitej 60 ml. Zastosowano ultratermostat, mieszadło magnetyczne oraz szklane reaktory o podwójnych ściankach, w których cyrkulowano wodę chłodzącą lub grzejącą. Stosunek objętości kapsułek do objętości roztworu substratu wynosił 1 : 10. Początkowe stężenie substratu w roztworze wynosiło 0,6 g/l, stężenie enzymu wewnątrz kapsułek – 1 lub 2 mg/l. Reakcję prowadzono przez 1 h, a próbki, w których oznaczano stężenie H_2O_2 zawracano do układu.

Wpływ pH na szybkość katalizowanej reakcji badano w 0,05 M buforze octanowym (pH 5,5) i w 0,05 M buforze HEPES (pH 6,4 i 7,0) w temp. 24 °C. Wpływ tempe-

ratury na aktywność preparatu określano w 0,05 M buforze HEPES (pH 6,4) w zakresie temp. $11 \div 40$ °C.

Stabilność enzymu immobilizowanego określano poprzez pomiar aktywności (jak opisano wyżej) po inkubacji preparatu w buforze o danym pH, w temperaturze przechowywania (4 °C), w obniżonej temperaturze reakcji (11 °C) i w temperaturze optymalnej (24 °C). Inkubacja poszczególnych preparatów trwała od 15 min do 40 dni. Media, w których inkubowano preparat, były wolne od zanieczyszczeń mikrobiologicznych (dodano H₂O₂ do stężenia 0,6 g/l). W przeciwnym razie preparat mógłby zostać rozłożony przez bakterie.

W celu wyznaczenia stałych równania kinetycznego, dla upewnienia się, że dyfuzja substratu nie miała wpływu na ilość rozkładanego nadtlenku wodoru (obszar kinetyczny procesu), wytworzono preparat alginianowy w postaci struktury płaskiej (stężenia alginianu, jonów wapniowych i enzymu były analogiczne jak w kapsułkach). Przez struktury te cyrkulowano roztwór substratu, mierząc ubytek substratu w czasie, w zbiorniku substratu (kolbie). Objętość preparatu wynosiła 0,8 ml, objętość cyrkulującego roztworu substratu – 20 ml. Stężenie substratu w poszczególnych eksperymentach wynosiło od 0,3 do 3 g/l, zaś stężenie enzymu w warstwie – 1 lub 2 mg/l. Próby (w trzykrotnych powtórzeniach) analizowano spektrofotometrycznie co 20 s przez pierwsze 5 min procesu, następnie przez 25 min, co 2 min. Po pomiarze próbki zawracano do układu.

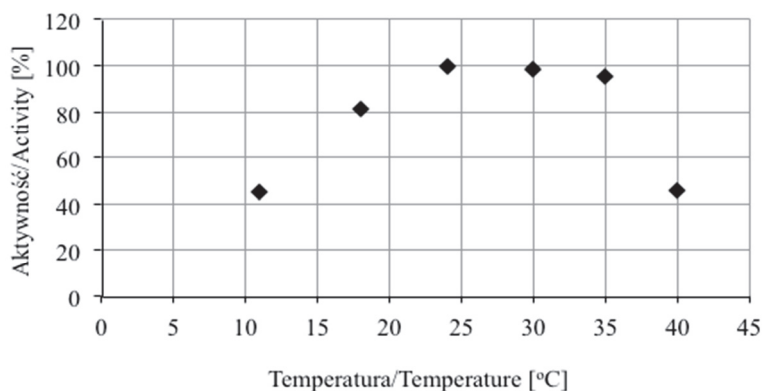
Aplikacja preparatu w naturalnych mediach: woda wodociągowa, sok warzywny, mleko kozie

Analogicznie do badań prowadzonych w buforach, przeprowadzono badania w naturalnych mediach tj. w wodzie wodociągowej (pH 7,0), w soku wielowarzywnym (pH 5,5) i w świeżym mleku kozim (pH 6,4). Z uwagi na barwę mleka i soku nie był możliwy pomiar spektrofotometryczny stężenia H₂O₂. Stąd też postęp reakcji określano na podstawie ilości powstającego produktu – tlenu, wykorzystując do tego celu elektrodę tlenową wbudowaną do reaktora mieszalnikowego BioFloBioreactor (New Brunswick, USA). Ruchy mieszadła były powolne (50 obr./min), aby nie uszkodzić kapsułek, a śmigło mieszadła ustawiono tuż pod powierzchnią cieczy (kapsułki znajdowały się głównie w części dolnej bioreaktora). Proces prowadzono w medium o objętości 1 l. Objętość kapsułek w stosunku do objętości medium wynosiła 1 : 10. Stężenie początkowe H₂O₂ w medium wynosiło 2,5 g/l, a stężenie enzymu wewnątrz kapsułek – 1 mg/l. Czas trwania procesu wynosił 2 h. Układ przy wyłączonym mieszadle pozostawiano na 30 dni, cyrkulując w płaszczu wodnym wodę o temp. 11 °C. Następnie dodawano nową porcję substratu i ponownie monitorowano postęp reakcji. Określano w ten sposób stabilność preparatu po 30 dniach użytkowania.

Wyniki i dyskusja

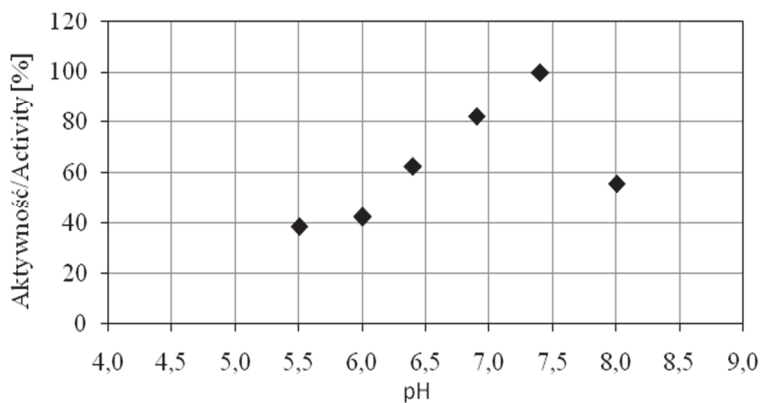
Aktywność i stabilność preparatu enzymatycznego

W celu określenia możliwości aplikacyjnych otrzymanego preparatu zbadano wpływ temperatury i pH na jego aktywność i stabilność enzymatyczną (rys. 1 i 2). Aktywność uzyskaną w temp. 24 °C (rys. 1) i w środowisku o pH 7,4 (rys. 2) przyjęto za 100-procentową.



Rys. 1. Wpływ temperatury na aktywność immobilizowanej katalazy

Fig. 1. Effect of temperature on activity of immobilized catalase



Rys. 2. Wpływ pH na aktywność immobilizowanej katalazy

Fig. 2. Effect of pH on activity of immobilized catalase

Preparat enzymatyczny wykazywał optimum aktywności w zakresie 24 ÷ 35 °C. Należy podkreślić, że w temp. 10 ÷ 11 °C, zbliżonej do temperatury wody wodociągowej i temperatury transportu mleka, ta aktywność była znacząca, co oznacza, że

preparat można stosować bezpośrednio (bez konieczności podgrzewania medium do temperatury otoczenia).

Katalaza immobilizowana w żelu, podobnie jak katalaza natywna [13], była aktywna w środowisku obojętnym. Optimum pH wynosiło ok. 7,4. Nie wykazano aktywności preparatu w reakcji prowadzonej w buforze octanowym poniżej pH 5,5. Ta wartość jest więc najniższym pH, w którym preparat może być stosowany. Zatem nie może być wykorzystywany do usuwania nadtlenu wodoru m.in. z soków owocowych, wina czy piwa.

W dalszych etapach pracy przeanalizowano trzy wartości pH, charakterystyczne dla wybranych grup produktów spożywczych, a mianowicie: pH 5,5 – soki warzywne, i herbaty mrożone wzbogacone sokami, pH 6,4 – napoje mleczne, czarna herbata i pH 7,0 – woda, zielona herbata. Badania prowadzono w temperaturze optymalnej (24 °C), w najniższej, w której preparat wykazywał aktywność w buforze (11 °C) oraz w temperaturze przechowywania preparatu (4 °C). Wyznaczono aktywność preparatu oraz jego stabilność procesową.

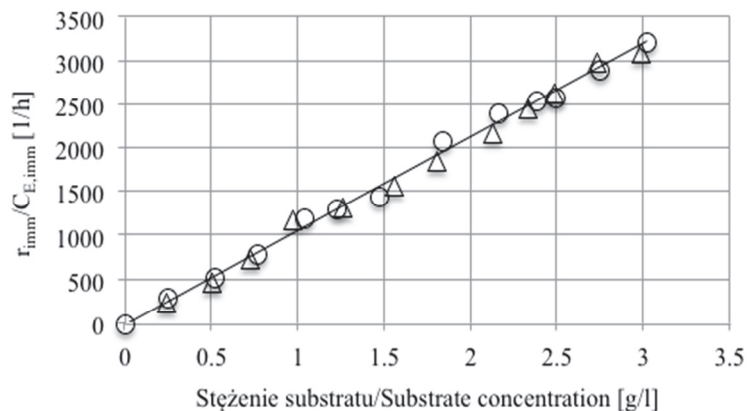
W zakresie stężenia enzymu do 2 mg/l wystąpiła liniowa zależność szybkości reakcji od stężenia enzymu. Powyżej tej wartości, z uwagi na szybkość powstającego produktu (O₂) i jego akumulację w kapsułce, następowało jej rozerwanie. W całym badanym zakresie substratu (do 3 g/l) szybkość reakcji była wprost proporcjonalna do zastosowanego stężenia (rys. 3). Stąd też szybkość reakcji enzymatycznej opisano za pomocą równania kinetycznego pierwszego rzędu względem substratu, o postaci [12]:

$$r_{imm} = -\frac{dC_s}{dt} \cdot \frac{V_{res} + V_{alg}}{V_{alg}} = k_{1,imm} \cdot C_{g,imm} \cdot C_s = k' \cdot C_s$$

gdzie:

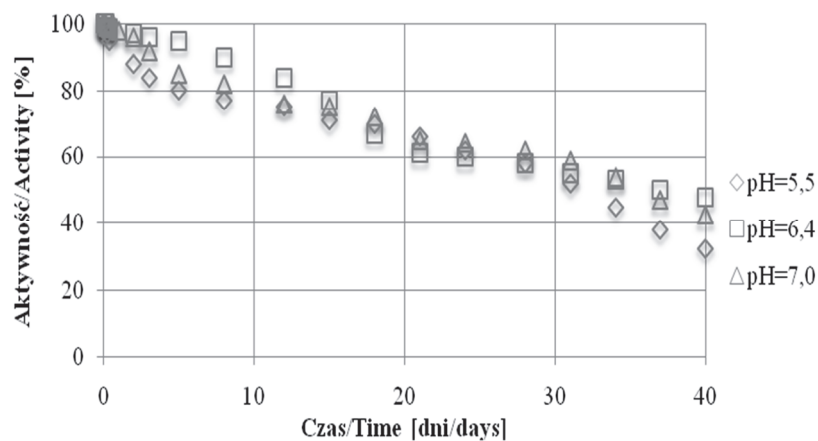
$C_{E,imm}$ – stężenie enzymu wewnątrz kapsułki [g/l], C_s – stężenie substratu [g/l], $k_{1,imm}$ – stała kinetyczna [l/g·h], k' – zmodyfikowana stała kinetyczna [1/h], r_{imm} – szybkość reakcji wewnątrz struktury alginianowej [g/l·h], t – czas [h], V_{alg} – objętość struktury (struktur) alginianowej [l], V_{res} – objętość rezerwuaru substratu [l].

Stabilność preparatu monitorowano w czasie, w założonej temperaturze i w buforze o danym pH, a następnie prowadzono reakcję mającą na celu określenie aktywności enzymatycznej. Aktywność tę, liczoną z początkowego przereagowania substratu ($\alpha < 10\%$), porównywano z aktywnością początkową preparatu wykazywaną przy tych warunkach procesowych. Na rys. 4. przedstawiono zależności uzyskane w temp. 11 °C. Czas połowicznego zaniku aktywności wyznaczono przy założeniu szybkości reakcji inaktywacji jako reakcji rzędu pierwszego [11]. Uzyskane wartości przedstawiono w tab. 1.



Rys. 3. Zależność jednostkowej szybkości reakcji ($r_{imm}/C_{E,imm}$) od stężenia substratu (11 °C, pH 6,4) – dane z serii przy $C_{E,imm} = 1$ mg/l (o) i 2 mg/l (Δ)

Fig. 3. Dependence of unit rate of reaction ($r_{imm}/C_{E,imm}$) on concentration of substrate (11 °C, pH 6.4) – data from series with $C_{E,imm} = 1$ mg/l (o) and 2 mg/l (Δ)



Rys. 4. Utrata aktywności enzymatycznej preparatu w czasie, w temp. 11 °C

Fig. 4. Loss of enzymatic activity of preparation over time, at temp. of 11 °C

Natywna katalaza z trzustki wołowej wykazuje bardzo niską stabilność [13]. Otrzymany preparat wykazywał dość dobrą stabilność w temp. 24 °C i bardzo dobrą w niższych temperaturach (czas połowicznego zaniku aktywności powyżej miesiąca). Im wyższe było pH układu, tym stabilność była większa, lecz wpływ pH nie był tak znaczący. Podobnie wysoką stabilność preparatu zawierającego immobilizowany biokatalizator w alginianie uzyskali inni autorzy [5, 8].

Tabela 1. Wartości stałej równania kinetycznego, stałej inaktywacji oraz czasu połowicznego zaniku aktywności, determinowane temperaturą oraz pH

Table 1. Values of kinetic equation constant, inactivation constant, and of half-life of enzymatic activity determined by temperature and pH

pH	Temperatura Temperature [°C]	Stała kinetyczna Kinetic constant $k_{1,imm}$ [l/g h]	Stała inaktywacji Inactivation constant [1/doba / 1/day]	Czas połowicznego zaniku aktywności Half-life of activity [dni / days]
5,5	4	-	0,015	45,9
	11	742,6	0,023	30,4
	24	1770,9	0,381	1,8
6,4	4	-	0,013	52,1
	11	1064,5	0,020	35,5
	24	2656,4	0,339	2,0
7,0	4	-	0,012	56,8
	11	1568,1	0,019	36,7
	24	3630,4	0,318	2,2

Właściwości i aktywność preparatu enzymatycznego w produktach spożywczych

Parametry kinetyczne wyznaczone w buforach o danych wartościach pH posłużyły do sprawdzenia użyteczności preparatu immobilizowanej katalazy w naturalnych mediach – zgodnie z opisem przedstawionym w metodyce – i określenia zgodności wyznaczonych wartości stałych w warunkach rzeczywistych.

W przypadku, gdy medium był sok wielowarzywny (pH 5,5), preparat wykazywał mechaniczną stabilność (nie ulegał rozpuszczeniu, degradacji czy odkształceniu). Na skutek dyfuzji barwników soku do wnętrza kapsułek, ulegały one trwałemu zabarwieniu na czerwono. Wartości oznaczonych stałych kinetycznych różniły się od otrzymanych w buforze octanowym (pH 5,5). Aktywność enzymu zmniejszyła się o 19,8 % ($k_{1,imm} = 595,6$ l/g h), a stała inaktywacji wzrosła do wartości 0,026 1/dzień, stąd czas połowicznego zaniku aktywności był krótszy i wyniósł 26,7 dni.

Drugim medium było świeże mleko kozie (pH 6,4). Preparat enzymatyczny był stabilny mechanicznie. Dodatkowo jony wapnia obecne w mleku stabilizowały preparat, co uwidoczniło się w jego większej twardości. Obecne w mleku białka i tłuszcz nie osadzały się w sposób widoczny na powierzchni kapsułek. Również bilans masy białek mleka (określony metodą Lowry'ego [4]) przed inkubacją kapsułek i po niej potwierdził brak ich istotnej adsorpcji na powierzchni preparatu. Stałe kinetyczne opisujące aktywność i stabilność enzymatyczną w buforze HEPES (pH 6,4) z dużą dokładnością opisywały proces przebiegający w mleku. Zaobserwowane różnice ($\pm 4,8$ %) były w zakresie błędu analitycznego.

W wodzie wodociągowej (pH 7,0) preparat był stabilny mechanicznie. Istniało ryzyko, że w wyniku niskiej siły jonowej, immobilizowany enzym nie będzie wykazywał zadowalającego poziomu aktywności, a jony wapnia będą się stopniowo wymywać, powodując rozluźnienie preparatu. Nie zaobserwowano jednak znaczących różnic pod względem właściwościach fizycznych (twardości, wielkości) preparatu. Aktywność preparatu nie uległa istotnej zmianie ($\pm 6,1$ % różnicy). Stabilność preparatu zmniejszyła się. W wodzie stała inaktywacji wynosiła 0,021 1/dzień, stąd czas połowicznego zaniku aktywności to 32,7 dni.

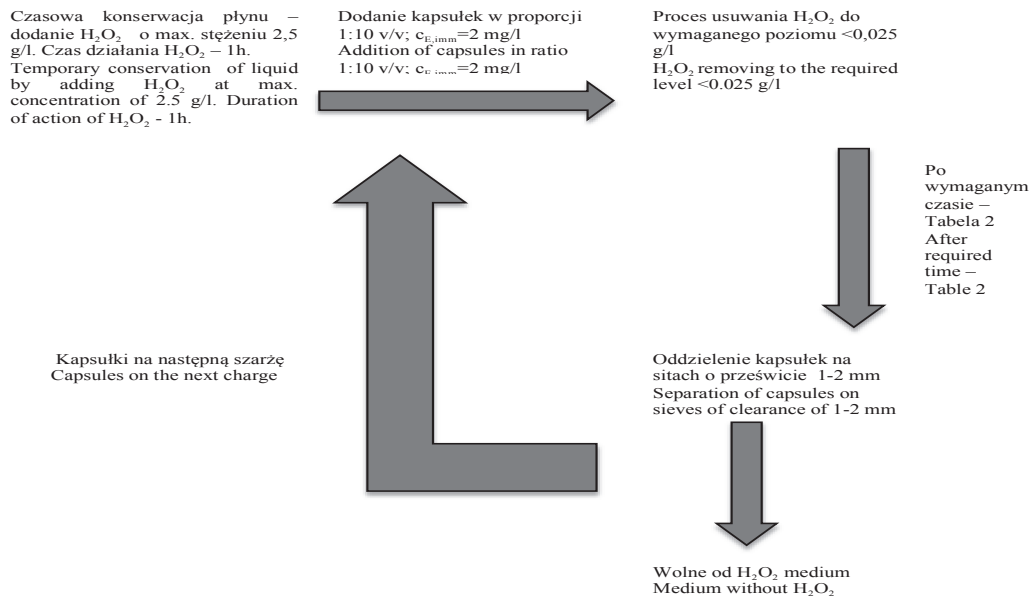
Wykorzystanie preparatu enzymatycznego w warunkach przemysłowych

Z uwagi na średnicę kapsulek (4 mm), ich separacja z mieszaniny reakcyjnej nie stanowiła problemu. Otrzymany preparat może być zastosowany zarówno w systemie okresowym, jak i ciągłym. W doświadczeniach prowadzonych w reaktorze mieszalnikowym wykazano, że niska burzliwość układu i odpowiednia wysokość zamontowania łopatki mieszającej (tuż pod powierzchnią) nie powodowały uszkodzeń mechanicznych preparatu, stąd układ zawierający bioreaktor mieszalnikowy został zaproponowany do przeprowadzenia procesu okresowego (rys. 5). Zaletą takiego reaktora jest wyrównanie stężeń w całej objętości, co wpływa na korzystny profil stężenia substratu wewnątrz kapsulek.

Z uwagi na zmniejszającą się aktywność preparatu enzymatycznego, kolejne szarże, o założeniach podanych na rys. 5, różniły się czasem trwania. Wyliczono czas trwania każdej z nich i przedstawiono w tab. 2.

Wnioski

1. Preparat kapsułkowanej katalazy może zostać wykorzystany do usuwania H_2O_2 z mleka, wody, soków warzywnych i innych płynów o pH z zakresu 5,5 ÷ 7,0.
2. Preparat był aktywny w zakresie temp. 10 ÷ 40 °C. W zależności od pH i stosowanej temperatury preparat immobilizowanej katalazy może być wykorzystany w kilku/kilkunastu szarzach. Czas trwania każdej z nich wydłuża się wraz z czasem użytkowania preparatu. Podwyższenie temp. z 11 do 24 °C z jednej strony znacząco



Rys. 5. Schemat procesu oczyszczania medium z wykorzystaniem kapsułek z katalazą

Fig. 5. Diagram of purification process of medium using capsules with catalase

Tabela 2. Czas trwania poszczególnych szarż. Temperatura – 11 °C, wykorzystanie preparatu do 30 % aktywności początkowej

Table 2. Duration time of particular charges. Temperature – 11 °C, utilization of preparation up to 30 % of initial activity

Szarża Charge	pH 5,5	pH 6,4	pH 7,0
	[h] / [%]	[h] / [%]	[h] / [%]
1	6,75 / 100	4,7 / 100	3,2 / 100
2	7,85 / 85,7	5,15 / 91,2	3,4 / 94,1
3	9,4 / 71,7	5,7 / 82,5	3,6 / 88,3
4	11,7 / 57,85	6,4 / 73,8	3,9 / 82,5
5	15,2 / 44,3	7,2 / 65,2	4,2 / 76,6
6	21,5 / 31,3	8,3 / 56,6	4,5 / 70,7
7	-	9,75 / 48,2	4,9 / 65,0
8	-	11,8 / 39,8	5,4 / 59,2
9	-	14,4 / 31,6	6,0 / 53,5
10	-	-	6,7 / 47,8
11	-	-	7,6 / 42,1
12	-	-	8,75 / 36,4
13	-	-	10,3 / 30,9

skraca czas procesu (przykładowo w środowisku o pH 6,4 – z 4,7 do 1,95 h w pierwszej szarży), ale liczba szarż zmniejsza się istotnie (w rozpatrywanym przypadku z 9 do 2).

3. Z uwagi na rozmiar kapsulek są one z łatwością oddzielane od cieczy, nawet tych o wyższej lepkości i gęstości, co przetestowano w soku warzywnym.

Praca wykonana w ramach działalności statutowej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej S30110/Z0311.

Literatura

- [1] Barłowska J., Chabuz W., Król J., Sz wajkowska M., Litwińczuk Z.: Wartość odżywcza i przydatność technologiczna mleka produkowanego w systemie intensywnym i tradycyjnym w trzech regionach wschodniej Polski. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, **4 (83)**, 122-135.
- [2] Gabryszuk M., Sekowski T., Metera E., Kuczyńska B., Rembiałkowska E.: Wpływ żywienia na zawartość składników bioaktywnych w mleku krów z gospodarstw ekologicznych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, **3 (88)**, 16-26.
- [3] FAO Report on the Meeting of Experts on the Use of Hydrogen Peroxide and Other Preservatives in Milk, FAO:57:11:8655, Interlaken, Switzerland, September 23-27, 1957.
- [4] Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R.: Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265-270.
- [5] Matto M., Husain Q.: Calcium alginate – starch hybrid support for both surface immobilization and entrapment of bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2009, **57**, 164-170.
- [6] Miciński J., Pogorzelska J., Kalicka A., Kowalski I., Szarek J.: Zawartość kwasów tłuszczowych w mleku krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej z uwzględnieniem ich wieku i fazy laktacji. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, **4 (83)**, 136-150.
- [7] Park K.: Superporous hydrogels for pharmaceutical & other applications. *Drug. Deliver. Technol.*, 2002, **38**, 40-44.
- [8] Safarik I., Sabatkova Z., Safarikova M.: Hydrogen peroxide removal with magnetically responsive *Saccharomyces cerevisiae* cells. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 7925-7928.
- [9] Tarhan L.: Use of immobilized catalase to remove H₂O₂ used in sterilization of milk. *Process Biochem.*, 1995, **30**, 623-628.
- [10] Traczykowski A., Szejniuk B., Budzińska K., Bochenek M., Jurek A., Sulewski M.: Effect of aluminum chloride and hydrogen peroxide on the elimination of filamentous bacteria in activated sludge. *Przem. Chem.*, 2014, **4**, 555-558.
- [11] Trusek-Hołownia A., Noworyta A.: Dipeptide enzymatic synthesis in a two-phase membrane reactor. *Chem. Pap.*, 2000, **54**, 442-447.
- [12] Trusek-Hołownia A.: A catalytic membrane for hydrolysis reaction carried out in the two-liquid phase system – Membrane preparation and characterisation, mathematical model of the process. *J. Membrane Sci.*, 2005, **259**, 74-84.
- [13] Tukul S., Alptekin O.: Immobilization and kinetics of catalase on to magnesium silicate. *Process Biochem.*, 2004, **39**, 2149-2155.

**ACTIVITY AND STABILITY OF CATALASE IMMOBILIZED IN ALGINATE CAPSULES
IN INDUSTRIAL APPLICATIONS****S u m m a r y**

The addition of hydrogen peroxide is an efficient method to inhibit the growth of microbial contaminants (bacterial and fungal) present in drinking water, milk, or juice. This technique is not commonly applied in Poland, but it is allowed in many countries provided that the hydrogen peroxide added to the product is completely removed from it prior to its release for consumption or for further processing. A rapid method of removing hydrogen peroxide could be the use of a catalase enzyme.

In order to make it possible to repeatedly use that enzyme preparation and to easily separate it from the reaction mixture, it was suggested to immobilize the catalase in alginate capsules. The potentiality of using the produced preparation for H₂O₂ removal was analyzed through adding it to various liquids: water, milk, and vegetable juices. The stability of the preparation was determined under the process conditions (11 and 24°C) and at a temperature for storing the preparation (4 °C). The values of the kinetic equation constants, determined in the buffers of a given pH value, were verified through the analyses of the above named liquids.

Based on the kinetic parameters, the processing conditions were determined for a planned process efficiency. A batch process including separation on sieves was proposed. The time of individual process charges was given. In the case of decreasing the process temperature to 11°C, the reaction time must be significantly longer; however, the number of performed charges (because of the maintained activity of the preparation) balances the effect of a longer process time. Performing the reaction at a lower temperature is also valid in the case of keeping the medium being purified under the refrigeration conditions, which is usually the case. A temperature of 11°C is the lowest value, at which the enzyme applied is active.

Key words: removal of hydrogen peroxide, catalase, alginate capsules, process conditions ☒